

บทที่ 3

วิธีการทดลอง

1. วัตถุดิบสมุนไพร

เจื่องแข้งม้า (ลำต้น) ที่มีอายุ 2 ปีขึ้นไป เก็บจากอำเภอสันป่าตอง จ.เชียงใหม่ ในช่วงเดือน พฤษภาคม-มิถุนายน 2549 ทำการตรวจพิสูจน์ชนิดพืชโดยเทียบกับตัวอย่างในพิพิธภัณฑ์คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และจัดทำ herbarium specimen เก็บไว้ที่พิพิธภัณฑ์คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ (No. 005978 และ No. 006066)

2. สารเคมี อุปกรณ์ และเครื่องมือ

2.1 สารเคมี

- | | |
|---|--------------------|
| 1. Absolute ethanol | Merck, Germany |
| 2. 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) | Wako, Japan |
| 3. Lambda Carrageenin | Sigma, USA |
| 4. Dipotassium peroxidodisulphate | Carlo Erba Reagent |
| 5. Ethylacetate | Labscan, Ireland |
| 6. Glacial acetic acid | Merck, Germany |
| 7. n-Hexane | Labscan, Ireland |
| 8. 6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid | Aldrich, USA |
| 9. L-ascorbic acid | Fisher, Italy |
| 10. Methanol | Labscan, Ireland |
| 11. Nitroblue tetrazolium (NBT) | Sigma, USA |
| 12. N-naphthylethylenediamine dihydrochloride | Fluka, Switzerland |
| 13. Phenazin methosulfate (PMS) | Sigma, USA |
| 14. Quercetin | ACROS, USA |

- | | |
|---|--------------------|
| 15. Reduced β -nicotinamide adenine dinucleotide
dinucleotide (NADH) | Sigma, USA |
| 16. Sodium nitroprusside | AnalaR |
| 17. Standard curcumin | Sigma, USA |
| 18. Standard rutin | Fluka, Switzerland |
| 19. Sulphanilamide | Fluka, Switzerland |
| 20. Tris base | USB |

2.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. เครื่องชั่งวิเคราะห์
 - OHAUS ARC 120
 - SARTORIUS ME 2155
2. Micropipet
 - GILSON MODEL PIPETMAN P20, P200, P1000
3. Preparative HPLC
 - SHIMADZU LC-8A
 - Inertsil® PREP-ODS column, 10 x 250 mm (GL Sciences Inc.)
 - UV/VIS detector
4. Ultraviolet-Visible Spectrophotometer
 - SPECTRONIC GENESYS2
5. Mass spectrophotometer
 - JEOL JMS-HX110 spectrophotometer
6. FT-IR Spectrophotometer
 - NEXUS-465, Thermo Nicolet Electron Corporation FT-IR Spectrophotometer
7. Microplate UV/VIS Spectrophotometer
 - Beckman Coulter
8. Vortex mixer
 - SUPER-MIXER 1291

9. TLC plate (silica gel GF254) ชนิด aluminium sheet ขนาด 20 x 20 ซม.

– Merck, Germany

10. pH meter

– Metrohm

11. Plethysmometer

– Ugo Basile, Italy

12. Rotary evaporator

13. TLC tank

14. Soxhlet's apparatus

15. Condenser

16. Round bottom flask

17. Heating mantle

– ELECTROMANTLE EM 0500/C MR1, ISOPAD U2/102

18. Erlenmeyer flask

19. Beaker

20. Water bath

– Heto

3. วิธีการทดลอง

3.1 การเตรียมวัตถุดิบสมุนไพร

นำวัตถุดิบเชิงแข็งมา (ล้าง) มาหั่นให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ และนำมาอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 50°C จากนั้นนำไปบดด้วยเครื่องบดสมุนไพร

3.2 การเตรียมสารสกัด

3.2.1 การสกัดพืชสมุนไพร แบ่งการสกัดออกเป็น 2 กลุ่มคือ

3.2.1.1 สกัดตามความมีขี้ของตัวทำละลาย

สกัดด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด เรียงลำดับดังนี้ คือ เอธิลอะซิเตท, เอทานอล

โดย Soxhlet's apparatus และน้ำ ใช้วิธี reflux

3.2.1.2 สกัดด้วยตัวทำละลายชนิดเดียว

- สกัดด้วยเอทานอล โดยใช้ Soxhlet's apparatus

- สกัดด้วยน้ำ โดยใช้วิธี reflux

3.2.2 การทำให้สารสกัดแห้ง

3.2.2.1 สารสกัดจากตัวทำละลายอินทรีย์ทำให้แห้งโดยการระเหยตัวทำละลายภายใต้

ความดันต่ำ

3.2.2.2 สารสกัดน้ำ ทำให้แห้งโดยวิธี spray dry

3.3 การศึกษาฤทธิ์ด้านการอักเสบในสัตว์ทดลอง

1. การเตรียมสัตว์ทดลอง

สัตว์ทดลองที่ใช้เป็นหนูขาว พันธุ์ Sprague-Dawley เพศผู้ น้ำหนัก 180 - 200 กรัม ทำการควบคุมสภาพแวดล้อมของห้องเลี้ยงสัตว์ทดลองให้มีแสงสว่าง 12 ชั่วโมง และมี 12 ชั่วโมง อุณหภูมิ $23.5 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ ได้รับน้ำและอาหารโดยไม่จำกัด

2. Carrageenin-induced rat paw edema⁽⁴¹⁾

- ชั่งน้ำหนักของหนูทดลอง แบ่งหนูออกเป็น 7 กลุ่ม กลุ่มละ 6 ตัว โดย

กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม ได้รับ 5 % polysorbate 80 (Tween 80®)

กลุ่มที่ 2 กลุ่มมาตรฐาน ได้รับแอสไพริน 300 mg/kg โดยการป้อน

กลุ่มที่ 3-5 กลุ่มตัวอย่าง ได้รับสารสกัดที่สกัดตามความเข้มข้นของตัวทำละลาย โดยเรียงลำดับดังนี้ คือ สารสกัดส่วนเอธิลอะซิเตท 100 mg/kg, สารสกัดส่วนเอทานอล 400 mg/kg และสารสกัดส่วนน้ำ 400 mg/kg โดยการป้อน

กลุ่มที่ 6 กลุ่มตัวอย่าง ได้รับสารสกัดเอทานอล 400 mg/kg โดยการป้อน

กลุ่มที่ 7 กลุ่มตัวอย่าง ได้รับสารสกัดน้ำ 400 mg/kg โดยการป้อน

- ทำการวัดขนาดของอุ้งเท้าหนูแต่ละตัวก่อนฉีด carrageenin โดยใช้ plethysmometer

- ป้อนหนูแต่ละกลุ่มด้วยสารที่จะทดสอบ หลังจากนั้น 30 นาที ทำการกระตุ้นให้เท้าหนูเกิดการบวมโดยการฉีด 0.05 ml 1% carrageenin เข้าที่อุ้งเท้า (subplantar injection)

- วัดขนาดของอุ้งเท้าหนู ที่เวลา 1, 3 และ 5 ชั่วโมงหลังฉีด carrageenin และทำการเปรียบเทียบขนาดของอุ้งเท้าหนูที่บวมขึ้น ณ เวลาต่าง ๆ โดยใช้สมการ

$$EV_x = PV_x - PV_0$$

$$\% EI_x = \frac{EV_x \text{ ของกลุ่มควบคุม} - EV_x \text{ ของกลุ่มทดลอง}}{EV_x \text{ ของกลุ่มควบคุม}} \times 100$$

EV_x ของกลุ่มควบคุม

เมื่อ	EV_x	=	edema volume (ml) ที่เวลา x
	PV_x	=	paw volume (ml) ที่เวลา x
	PV_0	=	paw volume (ml) ก่อนฉีด carrageenin
	$\% EV_x$	=	$\%$ edema inhibition ของยามาตรฐานหรือสารตัวอย่าง ที่เวลา x

3.4 การศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน

3.4.1 ABTS Method⁽²²⁾

1. เตรียม ABTS^{•+} stock solution โดยผสม ABTS 7 mM กับ K₂S₂O₈ 2.45 mM ในอัตราส่วน 1 : 0.5 mole/mole ตั้งทิ้งไว้ 12 ชั่วโมงเพื่อให้เกิดปฏิกิริยาอย่างสมบูรณ์
2. เตรียม working solution ABTS^{•+} โดยนำมาเจือจางด้วย absolute alcohol แล้วนำไปวัดค่า absorbance ที่ 734 nm ให้ได้ค่าประมาณ 0.7-0.9
3. เตรียมสารมาตรฐาน Trolox ให้มีความเข้มข้น 2.5, 2.0, 1.5, 1.0, 0.5 และ 0.1 mM และนำไปวัดค่า absorbance ที่ 734 nm เพื่อเตรียมกราฟมาตรฐาน
4. วัดค่า absorbance ของสารละลายตัวอย่าง และคำนวณหาค่า % Inhibition เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน Trolox

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{(A_{\text{reagent}} - A_{\text{standard}})}{A_{\text{reagent}}} \times 100$$

เมื่อ	A_{reagent}	=	ค่า Absorbance ของ working solution ABTS ^{•+}
	A_{standard}	=	ค่า Absorbance ของตัวอย่าง

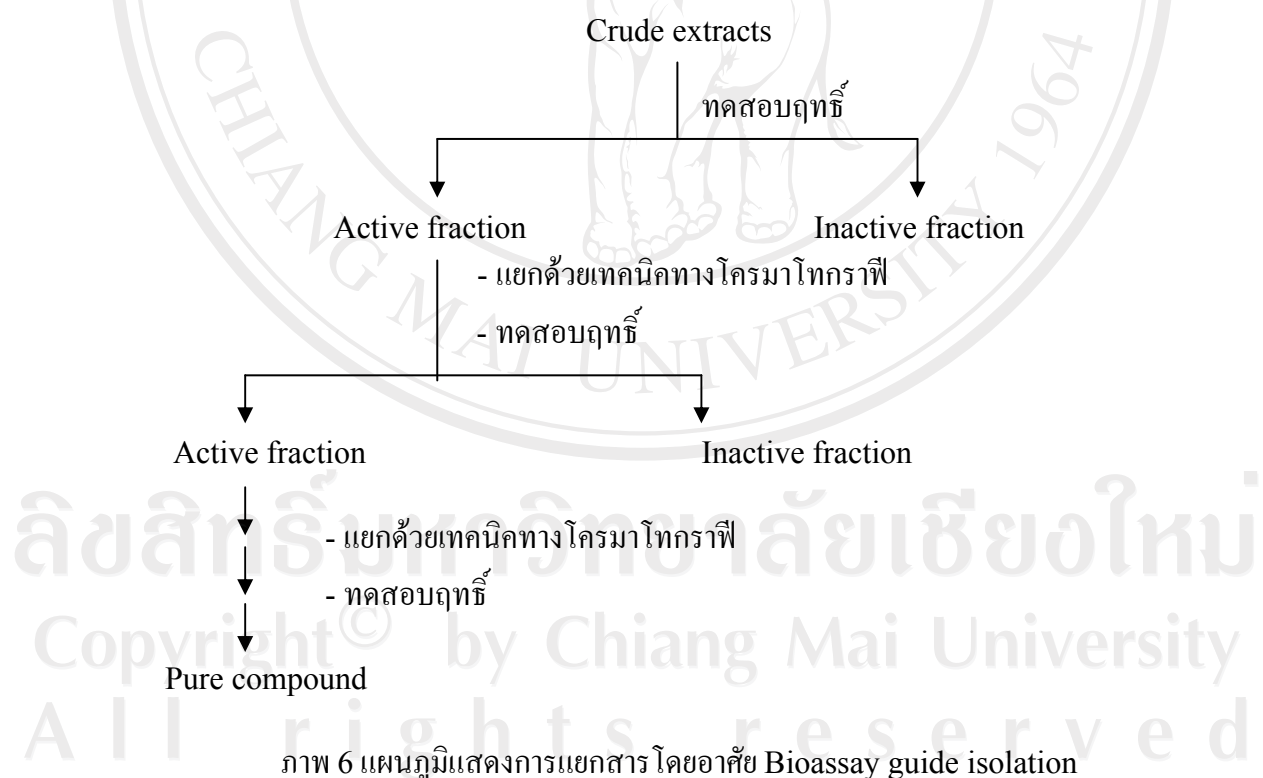
3.4.2 Scavenging effect on nitric oxide assay^(23, 24)

อนุมูลอิสระ nitric oxide เตรียมขึ้นโดยใช้ sodium nitroprusside (SNP) และวิเคราะห์โดยใช้ griess reagent ซึ่งประกอบด้วย 1 % sulfanilamide และ 0.1 % naphthylethylenediamine dihydrochloride ใน 2 % H₃PO₄ การทดสอบเริ่มจากเตรียมสารละลาย SNP ความเข้มข้น 100 mM ใน Phosphate buffer saline (pH 7.4) หลังจากนั้นบ่มสารละลาย SNP กับสารมาตรฐานหรือสารตัวอย่างที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ ณ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 150 นาที หลังจากนั้นเติม Griess reagent ในอัตราส่วน 1:1 แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm. โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน curcumin แล้วแปลผลออกมาเป็นค่า EC₅₀ (effective concentration (EC₅₀))

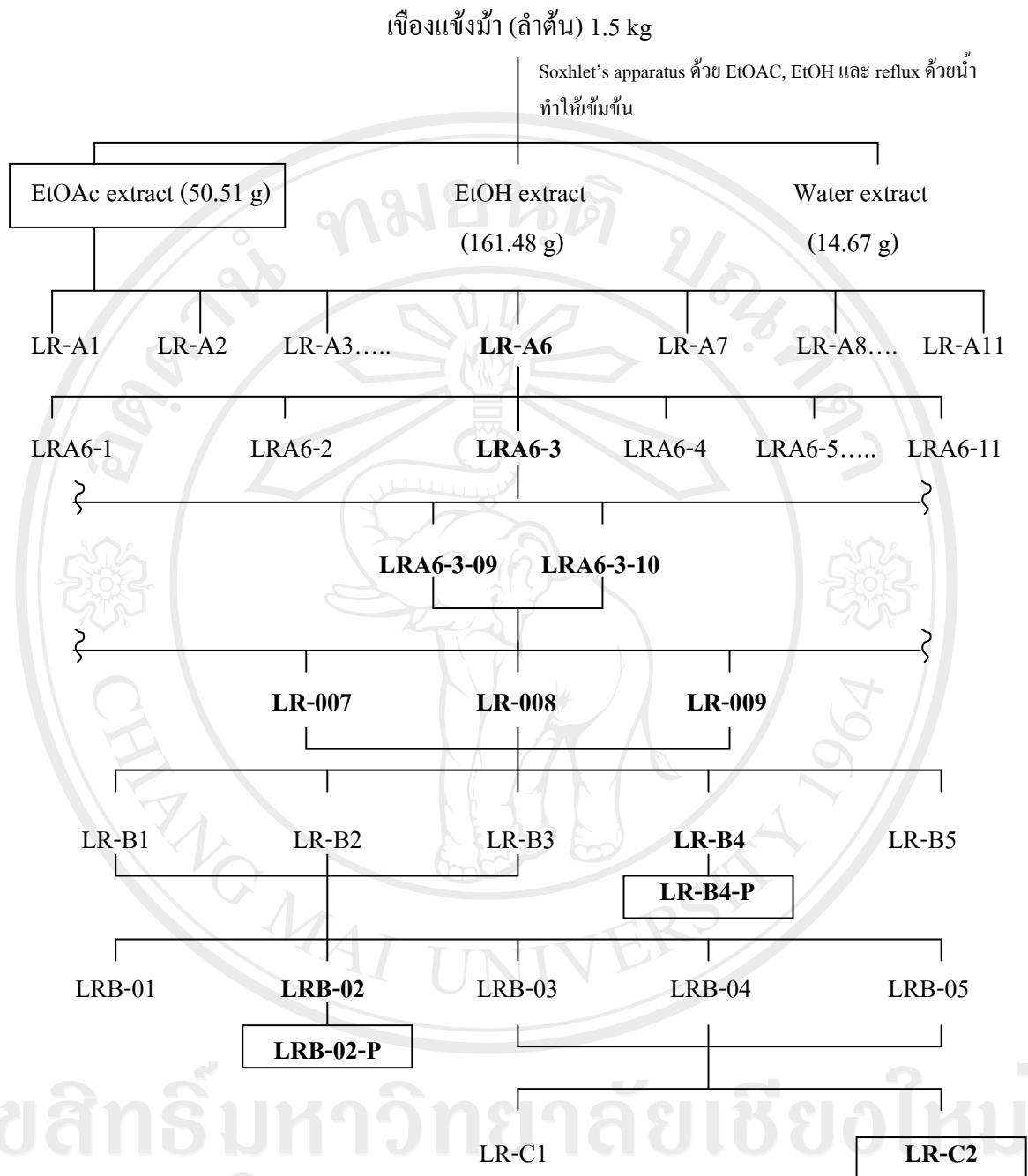
3.4.3 Scavenging effect on superoxide anion assay⁽²⁵⁾

อนุมูลอิสระ superoxide anion เตรียมขึ้นโดยใช้ระบบ phenazine methosulfate (PMS) และ reduced β -nicotinamide adenine dinucleotide dinucleotide (NADH) โดย การเกิดออกซิเดชันของ NADH ด้วย PMS และวิเคราะห์โดยอาศัยการเกิดรีดักชันของ nitroblue tetrazolium (NBT) วิธีทดสอบทำได้โดยการผสมสารละลาย NADH ความเข้มข้น 78 μ M กับ สารละลาย NBT ความเข้มข้น 50 μ M ใน phosphate buffer saline (pH 7.4) จากนั้นเติมสาร มาตรฐาน หรือสารตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่าง ๆ และเติมสารละลาย PMS ความเข้มข้น 10 μ M เพื่อเริ่มปฏิกิริยา และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที จากนั้นนำมาวัดค่าการดูดแสงที่ความยาวคลื่น 560 nm. โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน L-ascorbic acid แล้วแปรผลออกมาเป็นค่า 50 % (effective concentration (EC₅₀))

3.5 การแยกและการทำให้บริสุทธิ์ควบคู่กับการตรวจสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน



ภาพ 6 แผนภูมิแสดงการแยกสารโดยอาศัย Bioassay guide isolation



ภาพ 6 แผนภูมิแสดงการแยกสารสกัดส่วนเอธิลอะซิเตทของเชื่องแข้งม้า

3.5.1 การแยกสารสกัดส่วนเอธานอล

ทำการแยกสารสกัดส่วนเอธานอล โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี และนำไปทดสอบฤทธิ์ด้านออกซิเดชัน

3.5.2 การแยกสารสกัดส่วนเอธิลอะซิเตท

ทำการแยกสารสำคัญจากสารสกัดส่วนเอธิลอะซิเตท ควบคู่กับการตรวจสอบฤทธิ์ด้านออกซิเดชัน โดยอาศัยเทคนิคทางโครมาโทกราฟี ได้แก่ คอลัมน์โครมาโทกราฟี, Preparative HPLC และ Preparative TLC เพื่อให้ได้สารบริสุทธิ์

3.6 การตรวจลักษณะทางกายภาพและสเปกโทรสโกปี

ทำการตรวจลักษณะทางกายภาพและสเปกโทรสโกปีของสารบริสุทธิ์ที่ได้โดยใช้เทคนิคทางสเปกโทรสโกปี เช่น UV, IR